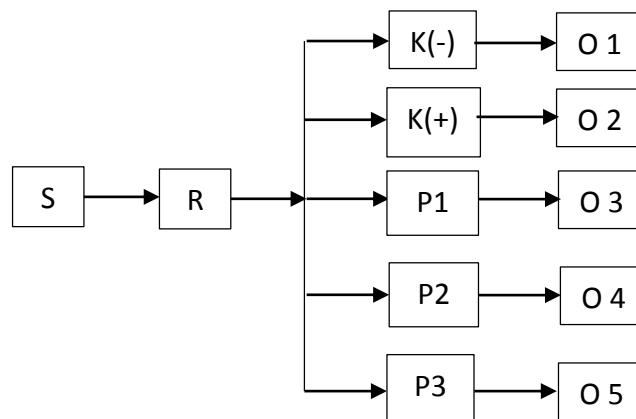


## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik menggunakan desain *randomize post test only control group desain*, yaitu dalam rancangan ini perlakuan atau intervensi telah dilakukan kemudian dilakukan pengukuran (observasi) atau post test. Penelitian ini menggunakan tikus putih jenis *Rattus norvegicus* strain wistar.



**Gambar 4.1 Rancangan Penelitian**

Keterangan :

S = Sampel

R = Random

K(-) = Kelompok kontrol 1 tidak diinduksi *P. gingivalis* dan tidak diberi antibodi IgY

K(+) = Kelompok kontrol 2 diinduksi *P. gingivalis* selama 2 minggu tanpa pemberian antibodi IgY

P1 = Kelompok perlakuan 1 pemberian antibodi IgY konsentrasi 15 µg/ml dan diinduksi *P. gingivalis* selama 2 minggu

- P2 = Kelompok perlakuan 2 pemberian antibodi IgY konsentrasi 30 µg/ml dan diinduksi *P. gingivalis* selama 2 minggu
- P3 = Kelompok perlakuan 3 pemberian antibodi IgY konsentrasi 45 µg/ml dan diinduksi *P. gingivalis* selama 2 minggu
- O 1 = Observasi pada K(-)
- O 2 = Observasi pada K(+)
- O 3 = Observasi pada P1
- O 4 = Observasi pada P2
- O 5 = Observasi pada P3

## 4.2 Sampel

Populasi penelitian ini adalah tikus putih jenis *Rattus novergicus* strain wistar. Sampel yang diambil adalah tikus putih jenis *Rattus novergicus* strain wistar yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

### 4.2.1 Kriteria Inklusi

- a. Jenis kelamin jantan usia 8-12 minggu
- b. Berat badan 150-200 gram
- c. Dalam kondisi sehat dan tidak cacat
- d. Tidak mengalami pengobatan atau paparan sebelumnya

### 4.2.2 Kriteria Eksklusi

- a. Tikus sakit pada masa penelitian
- b. Tikus mati pada masa penelitian

### 4.2.3 Metode Pengambilan Sampel

Dalam penelitian ini terdapat 5 perlakuan termasuk kontrol yang diberikan kepada subject penelitian, yaitu:

1. Kontrol negatif (K-) : tidak diberikan antibodi IgY dan *P. gingivalis*

2. Kontrol positif (K+) : diinduksi *P. gingivalis* selama 2 minggu tanpa pemberian anitbodi IgY
3. Perlakuan 1 (P1) : pemberian antibodi IgY konsentrasi 15 µg/ml dan diinduksi *P. gingivalis* selama 2 minggu
4. Perlakuan 2 (P2) : diet normal, pemberian antibodi IgY konsentrasi 30 µg/ml dan diinduksi *P. gingivalis* selama 2 minggu
5. Perlakuan 3 (P3) : diet normal, pemberian antibodi IgY konsentrasi 45 µg/ml dan diinduksi *P. gingivalis* selama 2 minggu

#### 4.2.4 Estimasi Jumlah Sampel

Menurut Solimun (2001), rumus perhitungan sampel adalah sebagai berikut

$$p(n-1) \geq 15$$

Dengan:

p = jumlah perlakuan

n = jumlah sampel

15 = nilai deviasi

Berdasarkan rumus tersebut, maka perhitungan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Berdasarkan hasil perhitungan diatas diperoleh bahwa pengulangan untuk setiap perlakuan dilakukan sebanyak 6 kali. Jadi total hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah  $6 \times 5 = 30$  hewan coba.

### **4.3 Variabel Penelitian**

#### **4.3.1 Variabel Bebas (*Independent*)**

Variabel bebas (*Independent*) pada penelitian ini adalah antibodi imunoglobulin y (IgY) dengan konsentrasi 15µg/ml, 30 µg/ml, dan 45 µg/ml

#### **4.3.2 Variabel terikat (*dependent*)**

Variabel terikat (*dependent*) pada penelitian ini adalah kadar PGE2

### **4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian**

#### **4.4.1 Lokasi**

Penelitian dilakukan pada tempat sebagai berikut:

1. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang sebagai tempat kultur dan pemeliharaan bakteri *P. gingivalis*
2. Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang sebagai tempat ekstraksi antibodi IgY
3. Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang sebagai tempat uji ELISA
4. Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang sebagai tempat pemeliharaan tikus dan pemberian perlakuan

#### **4.4.2 Waktu**

Penelitian ini berlangsung selama 1 bulan, yaitu pada bulan Mei sampai dengan bulan Juni 2017.

### **4.5 Alat dan Bahan**

#### **4.5.1 Alat/Instrumen penelitian**

1. Alat Pemeliharaan Hewan coba

Kandang dari bak plastik, tutup kandang yang terbuat dari anyaman kawat, botol air untuk minum, timbangan, tempat pakan, form pemantauan sisa pakan tikus dan form pemantauan berat badan tikus

2. Alat Pembuatan Makanan Tikus

Baskom plastic, timbangan, pengaduk, handscoon, gelas ukur, sonde

3. Alat ekstraksi antibodi IgY

Sendok, lancet, tube 50 ml, gelas ukur, pengaduk, vortexer, rolling mixer, sentrifugasi

4. Alat pemeriksaan kadar PGE 2

ELISA kit

#### **4.5.2 Bahan Penelitian**

1. Diet Normal (PARS, tepung terigu, air)
2. Bakteri *P. gingivalis*
3. Telur ayam
4. *Polyethylene Glycol* (PEG) 6000

#### 4.6 Definisi Operasional

1. Immunoglobulin Y (IgY) adalah antibodi yang didapatkan dari kuning telur ayam (*Gallus gallus domesticus*) yang sebelumnya telah diinduksi dengan bakteri *Porphyromonas gingivalis*. IgY didapatkan dengan metode ekstraksi purifikasi dengan test SDS-PAGE di Laboratorium Biomedik FKUB yang menunjukkan berat molekul IgY yaitu 180kDa. IgY diberikan dengan konsentrasi 15µg/ml, 30 µg/ml, dan 45 µg/ml pada 3 kelompok perlakuan. Konsentrasi ini ditetapkan berdasarkan penelitian yang dilakukan untuk vaksinasi anti *Vibrio cholera* dengan dosis efektif 20 mikrogram/ml.
2. Bakteri *Porphyromonas gingivalis* adalah bakteri melanogenik, nonsakarolitik, dan bagian dari koloni bakteri Black-pigmented Gram-negative anaerobes. Pada pewarnaan gram, bakteri ini menunjukkan warna violet. Bakteri ini dikultur dengan media BHI (Brain Heart Infusion) di Laboratorium Mikrobiologi FKUB dengan sertifikat karakteristik strain *P.gingivalis* oleh Balai Kesehatan Yogyakarta.
3. Kadar Prostaglandin E2 (PGE2) adalah kadar dari PGE2 yang diukur dengan menggunakan ELISA dari serum darah yang diambil dari jantung tikus putih menggunakan syringe 5 ml setelah perlakuan selama 2 minggu.

#### 4.7 Prosedur Penelitian

1. Pemberian Pakan Tikus

Kebutuhan pakan tikus perhari adalah 40 gram perhari. Seluruh tikus dalam seluruh kelompok mendapatkan diet makanan normal 40 gram per hari.

## 2. Pemilihan Tikus Galur Wistar

- a. 30 ekor tikus tikus putih (*Rattus novergicus* strain wistar) dipilih yang memenuhi syarat sampel, kemudian dibagi dalam 5 kelompok
- b. . Cara pemilihan tikus yaitu dengan memberi nomor urut pada tiap tikus, kemudian nomor undian ditulis pada kertas kecil lalu dilipat dan dimasukkan dalam kotak undian. Pemilihan secara acak agar setiap tikus mempunyai peluang yang sama untuk mendapat perlakuan.
- c. Pada akhir percobaan dilakukan pembedahan terhadap tikus untuk pengambilan sampel darah dari jantung dan kemudian diukur kadar PGE2.

## 3. Pembuatan Suspensi *P. gingivalis*

Cara membuat suspensi *P.gingivalis* adalah dengan mencampur 2 ml larutan BHI-B steril dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 ose *P.gingivalis* dan dihomogenkan diatas sentrifuge. Setelah dilakukan pengenceran dan penambahan aquades steril diukur absorbansinya dengan standar Mc Farland 0,5 dengan absorbansi 0,05 dan panjang gelombang 560 nm menggunakan spektrofotometer (Ermawati T, 2013).

## 4. Pemilihan Ayam

Dalam penelitian ini digunakan 4 ekor ayam petelur *Single Comb Lenghorn* berusia 24 minggu betina yang siap bertelur. Ayam dipelihara secara terpisah dalam kandang berukuran (128 x 65 x 80 cm) untuk empat ekor ayam dan diberi pakan komersil ayam petelur dan air minum *ad libitum*. Dalam penggunaan ayam sebagai keperluan penelitian, tempat pemeliharaan ayam

penting untuk lebih diperhatikan, lebih baik ayam dipelihara di dalam ruangan serta terdapat pembatasan peneliti yang dapat masuk (Schade, 2005).

#### 5. Produksi Antibodi IgY *P. Gingivalis*

Menggunakan 4 ekor ayam petelur *Single Comb Lenghorn* 24 minggu betina yang siap bertelur (Carlender, 2002), kemudian pada bawah sayap ayam yang sudah bertelur tersebut disuntikkan 30 µg antigen hasil elektroluensi melalui subkutan. Suntikan yang pertama dicampur dengan complete *Freud's adjuvan*. Suntikan kedua dan selanjutnya dicampur dengan incomplete *Freud's adjuvan* dengan selang waktu 1 minggu. Telur dipanen pada hari ke 5 sampai hari ke 17 setelah pemberian suntikan *booster* ke 2 (Susilo *et al.*, 2004).

Kuning telur dipisahkan dari bagian putih telur, kemudian diletakan diatas kertas saring untuk menghilangkan putih telur yang melekat. Membran kuning telur di lubangi dengan cara diangkat dengan pinset, cairan kuning telur ditampung pada gelas beker dan dilarutkan secara perlahan dalam mili-Q pH 4 dengan perbandingan 1:4. Setelah homogen ditambahkan lagi mili-Q pH 2 hingga suspensi 5,0 sampai 5,2 dan disimpan pada suhu 4 °C selama 20 menit dan supernatan diambil dan diperoleh *Water Soluble Fractination* (WSF). Selanjutnya WSF dibuat hingga pH 7.5. Ekstraksi dilanjutkan dengan PEG 6000 dan amonium sulfat. PEG digunakan untuk memisahkan lemak, mempresipitasi serta mengendapkan IgY (Poison *et al dalam* Pauly D, 2011). Amonium sulfat sering digunakan untuk memisahkan protein dalam larutan.



## 6. Uji SDS-Page

Uji SDS-Page ini digunakan untuk dapat mengetahui keberadaan IgY berdasarkan berat molekulnya. Proses elektroforesis (SDS-PAGE) ekspresi IgY menggunakan metode standar oleh Laemmli (Poetri *et al.*, 2008).

## 7. Uji Western Blot

Metode ini bertujuan untuk menguji apakah antibodi yang kita dapatkan dari telur ayam merupakan antibodi terhadap OMP dari *Porphyromonas gingivalis*. Dalam uji ini direaksikan antara antigen yaitu OMP *P.gingivalis* dengan antibodi primer yaitu IgY. Prosedur uji ini gel elektroforesis tanpa pewarnaan direndam dalam transfer buffer selama 40 menit. Membran nitroselulosa direndam dalam transfer buffer selama 40 menit. Filter tebal (2 buah) ditambah Kasa biasa (2 buah) direndam dalam transfer buffer selama 5 menit. Susun Sandwich terdiri dari filter tebal 2 buah, kertas saring 2 buah, Nitrocellulose membrane, gel, kertas saring 2 buah dan filter tebal 2 buah. Transfer pada 0,3 A, 20 Volt selama 2 jam. Cuci membrane nitroselulosa dengan aquadest untuk menghilangkan gel yang melekat. Rendam dengan Ponceau 2 % selama 3 menit. Cuci dengan aquadest sampai warna hilang. Blocking dengan TBS pH 7,4 dan BSA 3 % selama 2 jam menggunakan shaker pada suhu ruangan. Tambahkan antibodi primer perbandingan 1: 100 overnight pada suhu 4°C. Inkubasikan pada suhu ruangan pada shaker selama 2 jam. Cuci dengan TBS 3 kali 5 menit. Tambahkan substrat alkaline phosphatase selama 30 menit dan siap direkam.

#### 8. Aplikasi Antibodi IgY

Antibodi IgY diberikan kepada hewan coba menggunakan injeksi lokal dengan dosis 15 µg/ml, 30 µg/ml, dan 45 µg/ml sebanyak 1ml menggunakan syringe 1 ml diameter 30 gauge pada gingiva gigi anterior bawah . IgY diaplikasikan hanya pada hari pertama sebelum dilakukan injeksi *P. gingivalis*.

#### 9. Pemaparan *P. gingivalis* pada tikus

Tikus dipegang pada bagian ekor, kemudian tengkuk dipegang supaya tikus tidak bergerak, kemudian dilakukan injeksi *P.gingivalis* dengan konsentrasi 5µg/0,05mL sebanyak 0,2 mL pada sulkus gingiva gigi anterior bawah dengan menggunakan syringe 1 ml diameter 30 gauge dan diberikan seminggu tiga kali selama dua minggu. Injeksi dilakukan pada hari ke 1, 4, 7, 10, 13 setelah pemberian vaksin antibodi IgY. Pada hari ke-14, seluruh sampel dilakukan dekaputasi.

#### 10. Pengambilan Sampel

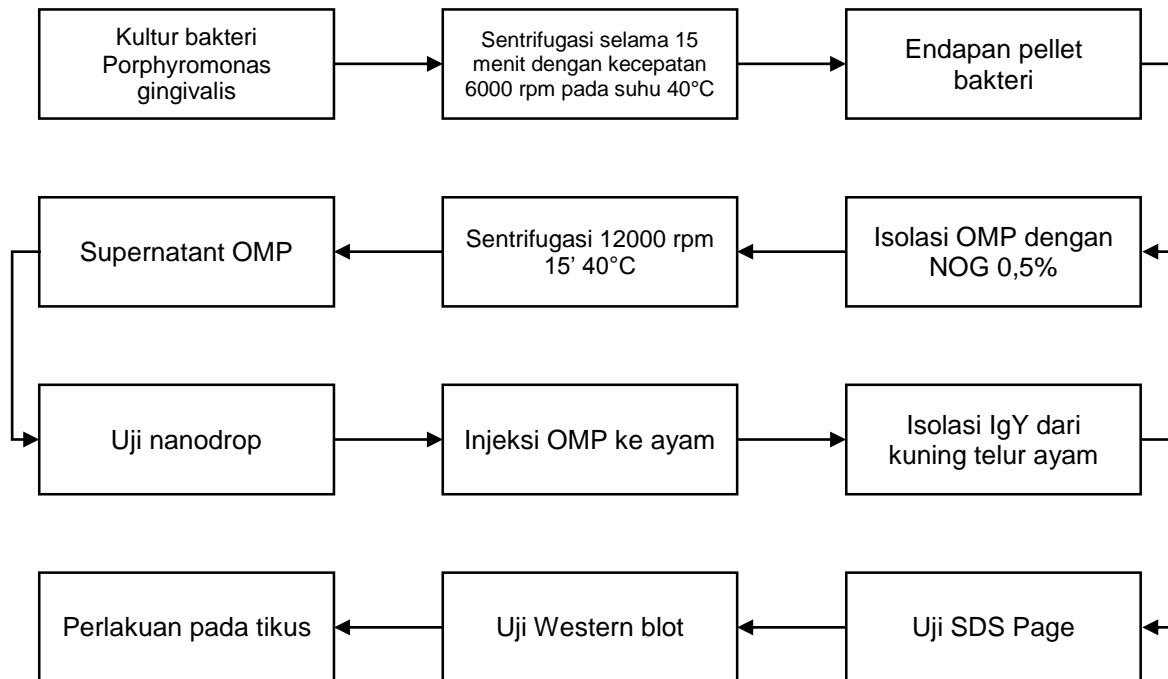
Enam ekor tikus putih pada setiap kelompok I, II, III, IV dan V dilakukan dekaputasi setelah 1 hari pemberian antibodi IgY dan 2 minggu pemaparan *P.gingivalis*. Dekaputasi dilakukan dengan cara menganastesi terlebih dahulu tikus dengan eter. Tikus dimasukkan ke dalam wadah tertutup yang terdapat obat anastesi eter di dalamnya, lalu ditunggu hingga tikus kehilangan kesadaran. Selanjutnya dilakukan pembedahan jantung tikus, dan pengambilan sampel darah sebanyak 3 cc. Kemudian darah disentrifuge untuk diambil serumnya, kemudian serum disimpan dalam *freezer* -20°C, sampai jumlah sampel mencukupi.

## 11. Pengukuran Kadar PGE2

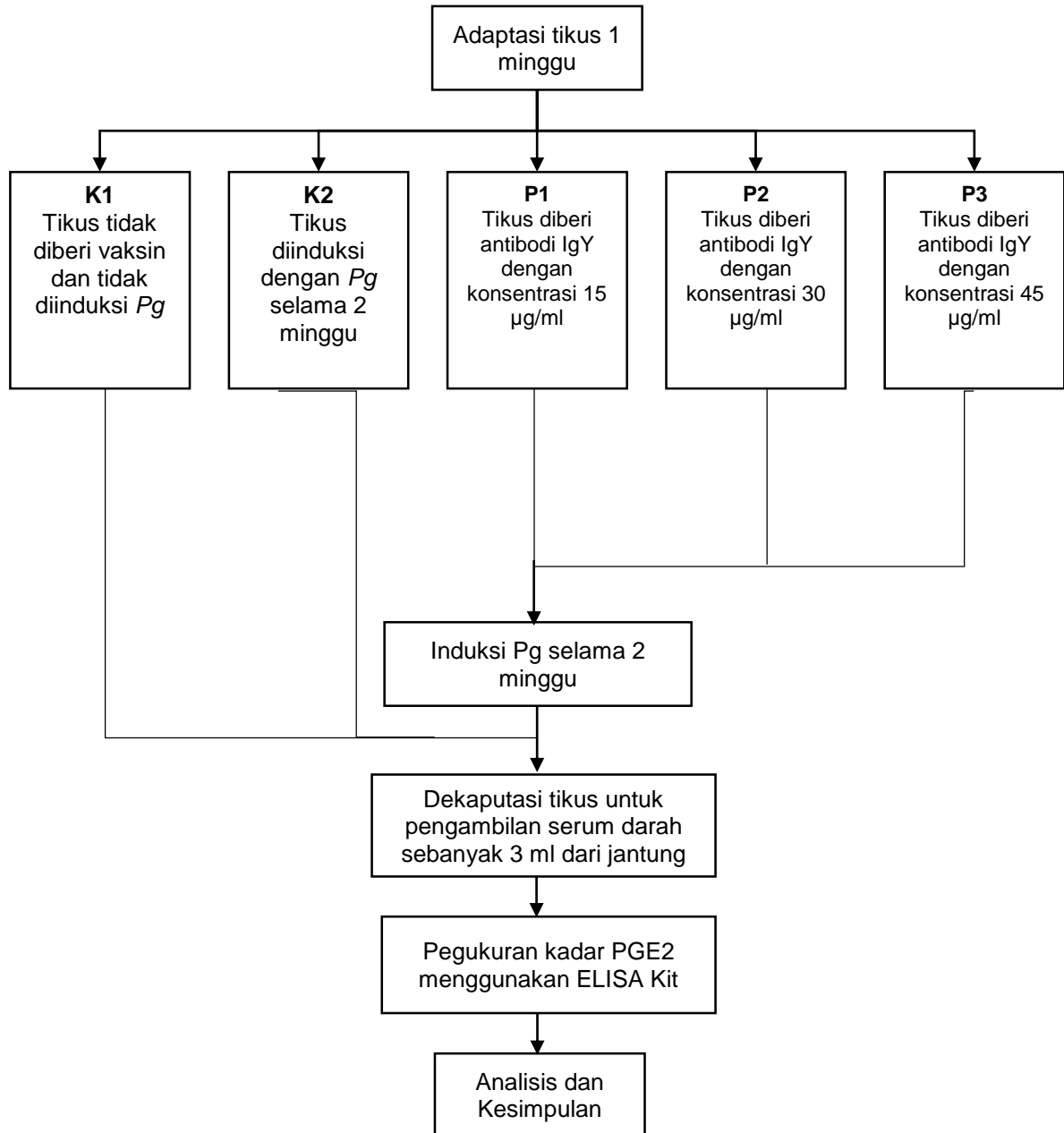
Pengukuran kadar PGE2 menggunakan ELISA kit. Dimana prosedur awal dimulai dengan coating antigen serum darah pada microplate lalu dilanjutkan dengan blocking buffer, penambahan antibodi primer, penambahan antibodi sekunder, dan penambahan streptavidin-horseradish peroxidase (SAHRP) sebagai enzim. Setelah itu, dilakukan penambahan stop solution untuk menghentikan reaksi dengan HCl yang dilanjutkan dengan inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Tahap akhir adalah dilakukan pengukuran absorbansinya menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang ( $\lambda=450$  nm).

## 4.8 Alur Prosedur

### 4.8.1 Isolasi IgY



#### 4.8.2 Perlakuan Tikus



#### 4.9 Analisis Data

Pengambilan data dan analisa data dilakukan setelah 1 bulan penelitian. Analisis ditentukan terhadap pengamatan kadar PGE2 pada tikus putih jenis *Rattus novergicus* strain wistar. Proses analisis data yang terlebih dahulu dilakukan adalah uji normalitas (*Shapiro-Wilk*) dan uji homogenitas/*test of homogeneity of variences*. Untuk mengetahui perbedaan rata-rata PGE2 antar kelompok kontrol dengan perlakuan digunakan uji statistik *One Way Anova*. Penelitian ini bermakna bila nilai  $p < 0,05$  dan hipotesis yang menyatakan bahwa antibodi IgY dapat menghambat peningkatan kadar PGE2 yang diamati dari ekspresinya pada tikus *Rattus novergicus* strain wistar terbukti. Namun apabila  $p > 0,05$  berarti hipotesis tersebut ditolak.  $H_0$  pada penelitian ini adalah tidak ada beda kadar PGE2 antar kelompok kontrol dan perlakuan,  $H_1$  pada penelitian ini adalah terdapat beda kadar PGE2 antar kelompok kontrol dan perlakuan.